

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C12N 1/21

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98111517.9

[43]公开日 1999年5月19日

[11]公开号 CN 1216777A

[22]申请日 98.9.30 [21]申请号 98111517.9
[71]申请人 徐根兴
地址 210049 江苏省南京市马群街2号4901信箱
基础部
[72]发明人 徐根兴 傅更锋 徐江英
樊燕蓉 刘新卷 汪振诚

[74]专利代理机构 江苏省专利事务所
代理人 徐冬涛

权利要求书1页 说明书3页 附图页数0页

[54]发明名称 转人实体瘤内皮抑制因子(Endostatin)基因双歧杆菌的方法

[57]摘要

本发明涉及一种人实体瘤血管的内皮抑制因子(Endostatin)基因通过改进的PEG法、氯化钙法及其它常规基因转化方法和pBV220载体转入到双歧杆菌中得到一种转Endostatin基因双歧杆菌。再进行继代选择性培养,从而获得转基因双歧杆菌,通过口服这种经表达处理后的转Endostatin基因双歧杆菌而定植于肠粘膜繁殖,或从中提取重组Endostatin制备成针剂,两者均可用于抗人实体瘤血管生成疗法的治疗之中。

ISSN 1008-4274

专利文献出版社出版

权 利 要 求 书

1. 一种转入实体瘤内皮抑制因子 (Endostatin) 基因双歧杆菌 (Bifidobacteria) 方法, 其特征是以含有人 Endostatin 基因的 p B V 2 2 0 这种具有温控原核表达元件的质粒作为转化载体, 以人源双歧杆菌为受体, 采用溶菌酶处理的 P E G 法和氯化钙法及其它常规转化方法处理, 再经继代选择性培养得到转基因双歧杆菌。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征是它包括以下步骤:

a. 把专利申请号为 9 7 1 0 7 1 1 2. 8 中人 Endostatin 基因经酶切转移到具有温控原核表达元件的 p B V 2 2 0 质粒 (见文献 1) 中, 经扩增提取和纯化, 制得所需的质粒载体;

b. 将作为受体的双歧杆菌厌氧培养到对数生长期, 然后用 1 m g / m l — 3 m g / m l 的溶菌酶 3 7 ° C 处理 0. 5 — 3 小时, 制得便于接受外源基因的双歧杆菌受体;

c. 采用适合于原核表达元件的质粒常规转化方法——P E G 法和氯化钙法, 用含 Endostatin 基因的 p B V 2 2 0 质粒对双歧杆菌受体进行转化处理;

d. 经上述转化处理的双歧杆菌经涂布于含有青霉素的常规培养基平板上抽真空后充氮气厌氧培养 4 8 — 7 2 小时, 然后挑取单菌落培养于常规培养液中扩增培养, 再如此重复接种至继代培养不低于 1 5 代。

3. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于转 Endostatin 基因双歧杆菌经表达处理后作为口服制剂——口服液、胶囊或肠溶胶囊可定植于肠粘膜繁殖, 可达到抗实体瘤血管生成疗法的治疗作用。

4. 根据权利要求 3 所述的方法, 其特征是于以脱脂奶粉作为冻干保护剂同上述转基因双歧杆菌菌泥一起冻干, 制备成口服胶囊 (或用双歧因子作保护剂冻干制备成肠溶胶囊) 而用于治疗人实体瘤。

5. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征是于转 Endostatin 基因双歧杆菌经表达处理后集菌纯化得到的重组 Endostatin, 制备成冻干粉针剂而用于人实体瘤血管生成疗法之中。

转人实体瘤内皮抑制因子 (Endostatin)

基因双歧杆菌的方法

本发明涉及一种人实体瘤血管的内皮抑制因子 (Human Endostatin, 以下简称Endostatin) 基因通过溶菌酶处理的 P E G 法、氯化钙法及其它常规转化方法转入到双歧杆菌中得到的一种转 Endostatin 基因双歧杆菌。这种转 Endostatin 基因双歧杆菌经表达处理后可作为口服制剂, 如口服液、胶囊或肠溶胶囊, 或从中提纯重组Endostatin作为针剂用于抗实体瘤血管再生治疗之中。

人实体瘤临床治疗方法目前是多种多样, 如手术、化疗、放疗、免疫疗法等等, 绝大部分是针对肿瘤细胞进行治疗, 用抑制剂或阻断剂来阻断或抑制实体瘤血管再生及血液供应方面的抗肿瘤血管生成疗法应用较少。

本发明的目的改变重组人Endostatin在大肠杆菌中表达纯化得到的针剂剂型方法, 改为通过温控质粒 p B V 2 2 0 (见文献1) 和通过转基因转化方法把人Endostatin基因导入到人体中既不产生内毒素又不产生外毒素的有益生理菌——双歧杆菌, 从而制备成转Endostatin基因双歧杆菌口服制剂, 或从中提纯获得重组人Endostatin作为针剂, 作为一种抗血管生成疗法用于治疗人实体瘤。

本发明的目的可以通过以下措施来达到:

本发明的方法是以含Endostatin外源人基因为例的具有原核表达元件的温控质粒 p B V 2 2 0 为转化载体, 以双歧杆菌为受体, 采用溶菌酶处理的 P E G 法和氯化钙法及其它质粒载体转化方法进行转化处理, 再将经转化处理后的双歧杆菌经继代选择性培养, 从而获得转Endostatin基因双歧杆菌。

本发明方法一般包括以下步骤:

(1) 将专利申请号为 9 7 1 0 7 1 1 2. 8 中的人Endostatin 基因通过酶切克隆入 p B V 2 2 0 载体中, 对携带有人Endostatin基因的 p B V 2 2 0 质粒按常规方法进行扩增、提取和纯化;

(2) 将双歧杆菌在常规双歧杆菌培养液中培养至对数生长期, 然后用 1 m g / m l — 3 m g / m l 溶菌酶 3 7 ° C 处理 0. 5 — 3 小时, 制备成能接受外源基因的双歧杆菌受体;

(3) 采用适合于原核表达元件的常规转化方法, 例如 P E G 法和氯化钙法, 用带有人Endostatin基因的 p B V 2 2 0 质粒对双歧杆菌受体进行转化处理;

(4) 将上述经转基因转化处理后的双歧杆菌扩增培养后涂布于含青霉素

的常规双歧杆菌培养基平板上厌氧培养48—72小时，然后挑取单一菌落于常规双歧杆菌液体培养剂内培养，再接种于涂布含青霉素的培养基平板上厌氧培养48—72小时，然后再挑取单一菌落于常规液体培养基中培养，如此反复接种培养至继代培养不低于15代，可用于大规模液体接种扩增培养，用常规温控质粒表达方法制备成转人Endostatin基因双歧杆菌口服制剂，或按专利申请号97107112.8中重组人Endostatin提取纯化方法，从经表达处理的转Endostatin基因双歧杆菌中提取纯化得到重组人针剂。

以下实施例将对本发明作进一步说明：

(1) 用常规基因克隆方法从专利申请号为97107112.8中的人Endostatin基因用NdeI和BamHI双酶切，同时将pBV220载体用EcoRI和BamHI双酶切，NdeI和EcoRI酶切完均用Klenow酶片段进行平头处理，然后将经酶切的人Endostatin基因插入到pBV220载体中，经转化入大肠杆菌DH α 中，用SmaI和BamHI酶切鉴定后接常规方法扩增，然后采用常规质粒提取方法纯化得到含人Endostatin基因的pBV220质粒载体。

(2) 将青春型双歧杆菌(*B. adolescentis*)或婴儿型双歧杆菌(*B. infantis*)在常规双歧杆菌培养液中扩增培养到OD₆₀₀为0.6—0.7时，离心集菌，用1mg/ml溶菌酶37℃处理1.5小时，制备成便于接受外源基因的双歧杆菌受体。

(3) 采用适于原核表达基因质粒常规转化方法，例如PEG法和氯化钙法，用含Endostatin基因的pBV220质粒对双歧杆菌受体进行转化处理。

(4) 将经上述转基因转化处理后的双歧杆菌扩增培养后，涂布于含100μg/ml青霉素的1.5%琼脂糖常规双歧杆菌培养平板上，抽真空后充少量氮气，厌氧37℃培养48小时，然后再挑取单一菌落于常规双歧杆菌培养液中培养18小时，再涂布于含100μg/ml青霉素的1.5%琼脂糖常规双歧杆菌培养平板上，抽真空后充少量氮气厌氧37℃培养48小时，然后再挑取单一菌落于常规双歧杆菌培养液中培养18小时，如此反复选择性培养15代(15个周期)，每代经常规提取质粒后1%琼脂糖DNA电泳鉴别所含基因质粒和经表达处理后SDS凝胶电泳鉴定重组人Endostatin表达情况，然后可用于扩增培养后冻干保存于-70℃或加1%灭菌烘干牛肉粉保存于4℃中分别作为1级和2级保藏菌种，生产时取2级菌种少许在常规双歧杆菌培养液中扩增培养，并按温控质粒表达方法经诱导表达，制备成转人Endostatin基因双歧杆菌口服制剂；或从中纯化制备成重组人Endostatin针剂。例如，经扩增表达后的转Endostatin基因双歧杆菌直接制备成口服液剂型，经质控鉴定，常规药效学试验、毒理药理和鸡胚血管生成抑制检测实验等卫生部规定的各种试验后报批批准文号，临床剂量为按每天早晚二次空腹服用各50ml转Endostatin基因双歧杆菌活菌微生态制剂，1个月作为1个疗程。

或以脱脂奶粉作为冻干保护剂同上述转基因双歧杆菌菌泥一起冻干，制备成口服胶囊（或用双歧因子等作保护剂冻干制备成肠溶胶囊），同样经卫生部规定的各种试验后报批批准文号，用于人实体瘤抗血管生成疗法之中。还可以以转Endostatin基因双歧杆菌作为原料，按照专利申请号为9 7 1 0 7 1 1 2.8中从大肠杆菌中提取重组人Endostatin的提取纯化方法，从转基因双歧杆菌中提取纯化得到重组人Endostatin针剂。这种方法的优点是双歧杆菌无外毒素和内毒素，纯化相对简单方便。而大肠杆菌有外毒素和内毒素，纯化纯度必须很高才能达到安全性要求。

本方法利用p B V 2 2 0转化载体（含人Endostatin基因的质粒）所含的抗青霉素基因，通过在培养基中加入青霉素成为选择性培养基，在这种培养基上对经转基因转化处理的双歧杆菌进行选择培养，已转化含有人Endostatin基因的p B V 2 2 0质粒的双歧杆菌则因含有抗青霉素基因而可以正常生长形成菌落，而未转化的双歧杆菌无抗青霉素的抗性基因，对青霉素极其敏感，因而不能生长而死亡。通过对转基因双歧杆菌进行提取质粒，琼脂糖DNA电泳、内切酶酶切、表达后SDS凝胶电泳等从分子水平上鉴定转人Endostatin基因双歧杆菌，结果表明，采用本发明方法转基因双歧杆菌具有较好的稳定性和重复性。并且最终口服剂型仍可用 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素抑制转基因双歧杆菌的生长，使之在体内不产生抗青霉素抗药性。所以本发明方法转基因双歧杆菌具有很好的安全性。

本发明方法适合于双歧杆菌的各种属。

本发明方法能够将含人Endostatin基因的p B V 2 2 0温控质粒转导入双歧杆菌中，从而获得转人Endostatin基因双歧杆菌，同样方法也适用于将其它外源人基因转入温控质粒而构成原核表达元件的基因质粒，并转导入双歧杆菌中，从而获得转人源基因的双歧杆菌。所以通过本发明可以建立稳定的双歧杆菌转化体系，用基因工程方法改良双歧杆菌菌种，并可将许多人体中存在的生理功能十分重要的一些基因转化入温控质粒中，再通过转化方法将其转导入双歧杆菌，对一些分子量小的基因表达产物通过转基因双歧杆菌直接制备成口服剂型，由双歧杆菌携带这些基因及基因表达产物进入人体肠道，并定植于肠粘膜繁殖，直接作用于人体达到类似基因治疗的目的。或对一些分子量大些的基因表达产物可从转基因双歧杆菌中提取目的蛋白，制备成针剂用于治疗目的，这一方法比现在通行的大肠杆菌、昆虫细胞和哺乳动物细胞表达系统相比，具有使用安全，生产工艺简单和成本低等突出优点。